

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
Д.Л.Пиневиц

2019 г.

Регистрационный №055-0419



**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ-УСТОЙЧИВОСТИ  
БАКТЕРИЙ-ОПОРТУНИСТОВ К АНТИСЕПТИЧЕСКИМ  
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ, ПРИМЕНЯЕМЫМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
МЕСТНЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н. доцент Скороход Г.А., к.м.н., доцент Гудкова Е.И., к.б.н.Циркунова Ж.Ф., Буткевич В.В., Слабко И.Н., к.м.н. доцент Канашкова Т.А., к.м.н. Чистый А.Г., Бердник Н.Н.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

17.05.2019

Регистрационный № 055-0419

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ-УСТОЙЧИВОСТИ  
БАКТЕРИЙ-ОПОРТУНИСТОВ К АНТИСЕПТИЧЕСКИМ  
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ, ПРИМЕНЯЕМЫМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
МЕСТНЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный  
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Г. А. Скороход, канд. мед. наук, доц.  
Е. И. Гудкова, канд. биол. наук Ж. Ф. Циркунова, В. В. Буткевич, И. Н. Слабко,  
канд. мед. наук, доц. Т. А. Канашкова, канд. мед. наук А. Г. Чистый,  
Н. Н. Бердник

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы оценки чувствительности-устойчивости бактерий-оппортунистов к антисептическим лекарственным средствам, применяемым для лечения местных гнойно-воспалительных заболеваний, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний и патологических состояний, вызванных бактериями-оппортунистами, а также контроль за циркуляцией в госпитальной среде устойчивых вариантов бактерий.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с местными гнойно-воспалительными процессами в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания, и (или) организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Оборудование и лабораторная посуда:**

1. Паровой стерилизатор (автоклав).
2. Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды ГОСТ 6709-72.
3. Облучатель бактерицидный.
4. Шкаф ламинарный (бокс биологической защиты).
5. Холодильник с температурой в камере от 4 до 8 °С.
6. Термостат суховоздушный, поддерживающий температуру 35±2 °С.
7. рН-метр, диапазон рН от 1 до 14, точность 0,01 рН.
8. Весы аналитические с точностью 0,01-0,1 мг.
9. Вортекс-шейкер для микропробирок.
10. Автоматические дозаторы переменного объема 5-10; 2-20; 100-1000 мкл.
11. Стерильные чашки Петри, диаметр 90-100 мм.
12. Пробирки.
13. Штатив для пробирок.
14. Мерный цилиндр объемом 50; 100 мл; 1л.
15. Микробиологические петли.
16. Горелка.
17. Планшеты полимерные, 96-луночные, П-образные, стерильные, однократного применения.
18. Планшеты культуральные, полимерные, 24-луночные стерильные однократного применения.
19. Денситометр DEN-1В или аналог.

### **Питательные среды, эталонные штаммы, реактивы и расходные материалы:**

1. Эталонные штаммы: *S. aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 11229.
2. Хлоргексидина биглюконат (Белмедпрепараты, Республика Беларусь).
3. Бетадин (Повидон-йод 10 %) (ЭГИС, Венгрия).
4. Триптиказо-соевый бульон (ТСБ).

5. Стерильный 0,85 % раствор хлорида натрия.
6. Редокс-индикатор ТТХ (трифенилтетразолий хлорид).
7. Твин 80.
8. Сапонин.
9. L-гистидин.
10. Лецитин.
11. Цистеин.
12. Пептон основной.
13. Этиловый спирт.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Методы, изложенные в инструкции, предназначены для оценки чувствительности-устойчивости бактерий-оппортунистов к антисептическим лекарственным средствам, применяемым для лечения местных гнойно-воспалительных заболеваний.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Подготовительный этап**

Приготовление питательной среды, нейтрализатора, инокулюма тест-культур

#### *1. Приготовление питательной среды*

Триптиказо-соевый бульон готовят из стандартной сухой питательной среды: 30 г сухой питательной среды растворяют в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при 120 °С в течение 15 мин.

#### *2. Приготовление раствора индикатора*

Индикатор ТТХ 2-3-5 (трифенилтетразолий хлорид).

0,4 г ТТХ растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды. Полученный 0,4 % раствор разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при 120 °С в течение 10 мин.

#### *3. Приготовление раствора универсального нейтрализатора антисептиков*

Для нейтрализации антисептиков используют универсальный нейтрализатор, содержащий твин 80 (3 %), сапонин (0,3 %), гистидин (0,1 %), лецитин (0,3 %), цистеин (0,1 %), пептон основной (1,0 %). Раствор нейтрализатора доводят до рН 7,0±0,2 и стерилизуют паром при 1,1 атм. (121 °С) 20 мин. Нейтрализатор хранят в холодильнике не более 14 сут.

#### *4. Приготовление инокулюма*

Для исследования используют чистую культуру бактерий, выращенную в течение 18-24 ч на скошенном мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре 35±2 °С. Суспензии исследуемых тест-культур готовят смыванием физиологическим раствором с последующей стандартизацией по Мак-Фарланду до 9,0x10<sup>8</sup> КОЕ\мл (McFarland Standard 3,0).

## **Метод оценки чувствительности-устойчивости планктонных культур бактерий-оппортунистов к антисептикам терапевтического назначения**

При оценке чувствительности-устойчивости используют стандартные аптечные формы антисептиков, применяемые в клинической практике.

### *1. Подготовка 96-луночного планшета*

После извлечения планшета из стерильной упаковки производят его разметку. На крышке планшета в горизонтальных рядах лунок обозначают названия антисептиков и их пошаговые двойные разведения, в вертикальных — номера исследуемых клинических изолятов, эталонных штаммов (приложение, рисунок 1).

### *2. Приготовление разведений антисептиков*

Согласно разметке в первые обозначенные горизонтальные ряды для определенного антисептика вносят по 300,0 мкл его разведения, выполненного в ТСБ в соотношении 1/2, а в расположенные ниже ряды — по 150,0 мкл. Затем из лунок с исходными разведениями забирают по 150,0 мкл содержимого с последующим последовательным перенесением данного объема в нижние ряды лунок для получения разведений 1/4, 1/8, 1/16 и т. д. Из лунок с последним разведением часть содержимого в объеме 150,0 мкл удаляют.

### *3. Проведение исследования*

В вертикальные ряды лунок с разведениями антисептиков вносят по 30,0 мкл стандартизованной суспензии тест-культур. Планшеты закрывают крышкой и помещают в термостат при 37 °С на 18-24 ч.

После извлечения планшета из термостата во все лунки вносят по 30,0 мкл 0,4 % раствора ТТХ с повторным помещением в термостат на 3-4 ч.

### *4. Учет результатов*

Учет результатов выполняют по изменению цвета среды. Окрашивание среды в красный или бордовый цвет свидетельствует о жизнеспособности бактерий и, следовательно, устойчивости тест-культуры к данному разведению антисептика. Последнее разведение антисептика, при котором не происходит изменения цвета среды и является максимальным ингибирующим разведением (МИР) для исследуемой тест-культуры.

При исследовании средств, имеющих интенсивную окраску, например, бриллиантовый зеленый, фукокорцин, вместо индикации роста культуры по изменению цвета ТТХ, необходимо использовать высев из лунок с разведениями антисептика на плотные питательные среды.

### *5. Определение бактерицидной активности антисептиков*

После учета результатов определения МИР, можно установить наличие и степень максимального бактерицидного разведения (МБР). Для этого в ряды лунок с неизменным цветом среды вносят по 50,0 мкл универсального нейтрализатора. После перемешивания содержимое лунок высевают по 20,0 мкл на чашки Петри с плотной питательной средой (МПА). Результаты учитывают после суточной инкубации чашек при температуре 37 °С. Наличие роста в зоне посева свидетельствует о бактериостатической активности, отсутствие — о бактерицидной.

## 6. Контроли

### 6.1. Контроль культуры, положительный контроль.

В лунки с 150,0 мкл ТСБ вносят 30,0 мкл стандартизированной исследуемой тест-культуры, а затем 30,0 мкл 0,4 % раствора ТТХ. Изменение цвета среды свидетельствует о жизнеспособности тест-культуры.

### 6.2. Контроль питательной среды (КС), отрицательный контроль

В лунки с 150,0 мкл ТСБ (без внесения тест-культуры) вносят 30,0 мкл 0,4 % раствора ТТХ. Отсутствие изменения цвета свидетельствует об отсутствии контаминации среды.

### 6.3. Контроль достоверности полученных результатов

Для контроля результатов чувствительности-устойчивости используют значения МИР (таблица 1), полученные на эталонных штаммах *S. aureus* и *E. coli*.

Таблица 1. — Контрольные значения МИР для планктонных культур

Антисептик	Значение МИР	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Хлоргексидина биглюконат	64-128	64-128
Бетадин	8-16	4-8

При получении значений МИР, не выходящих за пределы контрольных, указанных в таблице, можно выполнять учет результатов.

### 7. Показатели чувствительности-устойчивости бактерий:

7.1. МИР соответствует максимальному разведению антисептика от его рабочей концентрации, при котором отмечается ингибирование роста исследуемой культуры.

7.2. МБР соответствует максимальному разведению антисептика от его рабочей концентрации, при котором отмечается полная гибель исследуемой культуры.

7.3. МИР<sub>100</sub>, при котором отмечается ингибирование роста всех тест-культур определенного вида.

Чем больше величины МИР и МБР, тем активнее при прочих равных условиях антисептическое средство или чувствительнее культура.

## Метод оценки чувствительности-устойчивости биопленочных культур бактерий-оппортунистов к антисептикам терапевтического назначения

### 1. Подготовка 24-луночного планшета

После извлечения планшета из стерильной упаковки выполняют его разметку. На крышке планшета в горизонтальных рядах обозначают названия антисептиков и степень их разведения, в вертикальных — исследуемые клинические изоляты бактерий, эталонные штаммы (рисунок 2).

### 2. Формирование биопленочных культур бактерий

Для формирования биопленок бактерий во все ряды лунки планшета вносят по 700,0 мкл ТСБ с последующим добавлением согласно разметке по 70,0 мкл стандартизированных по Мак-Фарланду до  $9,0 \times 10^8$  КОЕ/мл (McFarland Standard 3,0) 24-часовых исследуемых тест-культур бактерий. Планшеты закрывают крышкой

и на двое суток помещают в термостат при 37 °С для формирования бактериальных биопленок.

### *3. Приготовление разведений антисептиков*

Используют стандартные аптечные формы антисептиков, применяемые в клинической практике. Разведения антисептиков готовят вне планшетов после формирования биопленочных культур на момент их внесения, на ТСБ, в объемном соотношении начиная с разведения 1/2.

### *4. Проведение исследования*

Спустя двое суток инкубации планшеты извлекают из термостата. Из всех лунок автоматической пипеткой с обязательной сменой наконечников для каждой тест-культуры удаляют надосадочную среду. Визуально убеждаются в формировании микробных биопленок на дне лунок. После чего, согласно протоколу исследования и разметке планшеты, в лунки вносят по 1000,0 мкл разведений определенного антисептика. Планшет повторно помещают в термостат на одни сутки.

После извлечения планшет из термостата, из лунок с обязательной сменой наконечников для каждой аспирируют антисептик с последующим внесением в них по 1000,0 мкл ТСБ. Планшеты на 2-3 ч помещают в термостат. После извлечения из термостата во все лунки вносят по 50,0 мкл 0,4 % ТТХ, планшеты помещают в термостат на 2-3 ч.

### *5. Учет результатов*

Учет результатов выполняют по изменению цвета среды. Окрашивание среды в красный или бордовый цвет свидетельствует о жизнеспособности бактерий и, следовательно, неэффективности антисептика в данном разведении. Последнее разведение антисептика, при котором не происходит изменения цвета среды, является МИР для исследуемой биопленочной тест-культуры.

При исследовании средств, имеющих интенсивную окраску, например, бриллиантовый зеленый, фулорцин, вместо индикации роста культуры по изменению цвета ТТХ, необходимо использовать высев из лунок с разведениями антисептика на плотные питательные среды.

### *6. Определение бактерицидной активности*

При определении бактерицидной активности антисептиков, т. е. МБР, в ряды лунок с исходным цветом среды вносят по 500,0 мкл универсального нейтрализатора, и после перемешивания из содержимого лунок по 20,0 мкл высевают на плотные питательные среды. Учет результатов осуществляют после суточной инкубации чашек при температуре 37 °С. Наличие роста в зоне посева свидетельствует о бактериостатической активности, отсутствие — о бактерицидной.

### *7. Контроли*

#### *7.1. Контроль биопленочной культуры, положительный контроль.*

В лунки с биопленочной культурой вместо антисептика, вносят по 1000,0 мкл ТСБ с последующим внесением 50,0 мкл ТТХ. Изменение цвета среды свидетельствует о жизнеспособности биопленочной культуры.

## 7.2. Контроль чувствительности-устойчивости биопленочных культур бактерий

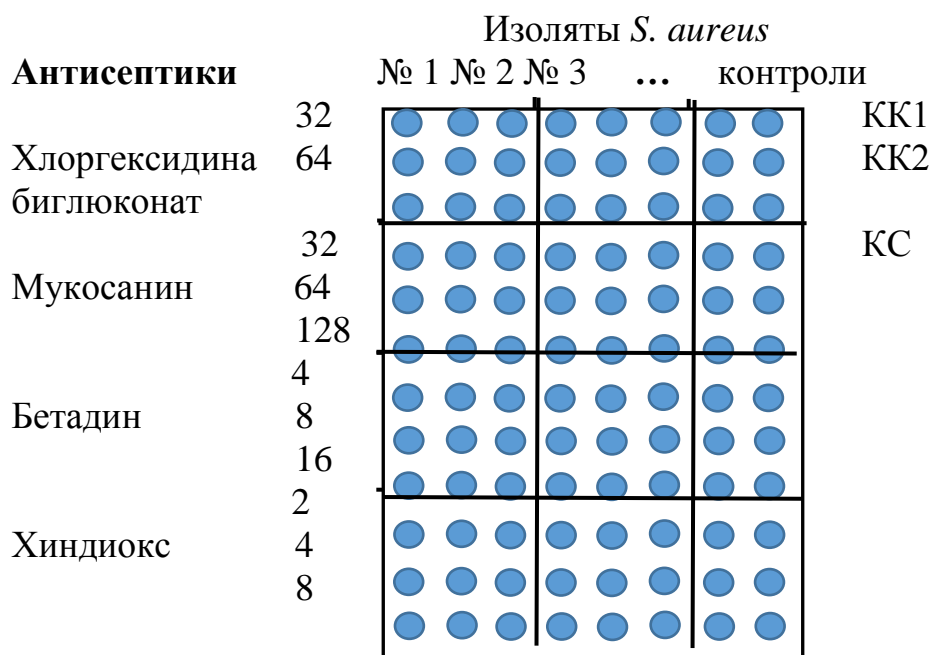
Для контроля результатов чувствительности-устойчивости используют значения МИР (таблица 2), полученные на эталонных штаммах *S. aureus* и *E.coli*.

Таблица 2. — Контрольные значения МИР для биопленочных культур

Антисептик	Значение МИР	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Хлоргексидина биглюконат	8-16	4-8
Бетадин	8	8

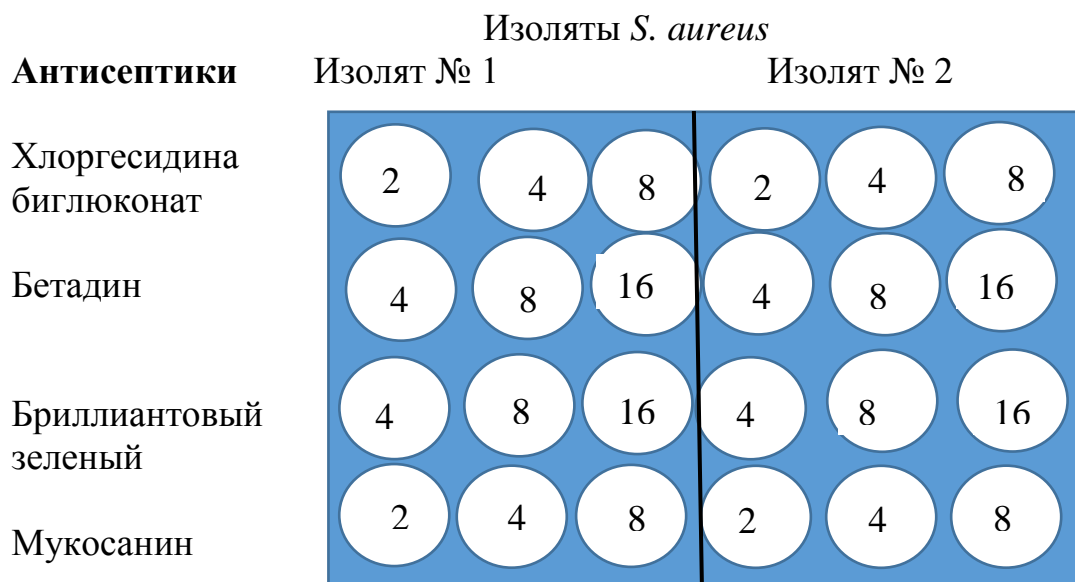
При получении значений МИР, не выходящих за пределы контрольных, указанных в таблице, можно выполнять учет результатов





**Рисунок 1. — Пример разметки 96-луночного планшета при оценке чувствительности устойчивости планктонной культуры**

К1 — контроль культуры № 1; К2 — контроль культуры № 2;  
КС — контроль питательной среды



**Рисунок 2.— Пример разметки 24-луночного планшета при оценке чувствительности-устойчивости биопленочной культуры**